

Das Verhalten der
Hyaluronidasehemmung bei akuter
und chronischer
Chloroquin-(Resochin-)Applikation

von

ALBERT FUMY

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Das Verhalten der Hyaluronidasehemmung bei akuter und
chronischer Chloroquin-(Resochin-)Applikation

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Albert Fumy

aus

Greiding /Mfr.

1959



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 1959

Inhaltsverzeichnis

Problematik	4
Eigene Versuche	6
Methodik	6
Versuchsreihe 1	7
Versuchsreihe 2	7
Versuchsreihe 3	10
Statistische Auswertung	10
Diskussion	26
Zusammenfassung	29
Literaturverzeichnis	30



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555228_0052

Problematik

In zahlreichen Arbeiten haben M a t h i e s ¹⁻⁷ und Mitarbeiter ⁸⁻¹¹ die hyaluronidasehemmende Wirkung antirheumatischer Substanzen und Behandlungsmethoden näher untersucht. Auf die Zusammenhänge der hyaluronidasehemmenden Wirkung der Antirheumatika mit ihrem therapeutischen Effekt wurde in zusammenfassenden Übersichten ^{1,12,13} ebenfalls hingewiesen. Es besteht kein Zweifel darüber, daß der hyaluronidasehemmende Effekt der Antirheumatika nicht deren therapeutisches Prinzip darstellt, wohl ist es aber möglich, daß in der Hyaluronidasehemmung ein wichtiger Teileffekt zu sehen ist. Viele der gebräuchlichen Antirheumatika haben neben ihrer hyaluronidasehemmenden Wirkung auch einen bedeutenden analgetischen Effekt, wie z.B. die Salicylate und das Phenylbutazon, Substanzen, die von M a t h i e s ¹⁻⁷ und Mitarbeitern ⁸⁻¹¹ hinsichtlich ihrer hyaluronidasehemmenden Wirkung untersucht wurden. Auffällig ist jedoch, daß alle bisher in der Rheumatherapie angewandten Substanzen und Behandlungsmethoden einen hyaluronidasehemmenden Effekt nachweisen lassen. Moorbäder z.B. haben keinen analgetischen Effekt, dagegen zeigen sie eine ausgeprägte hyaluronidasehemmende Wirkung (R ö s c h ¹¹). Auch die Analgesie, die durch Chloräthylbenzmethoxazon erzielt wird, ist gering, dagegen zeigt diese Substanz ebenfalls einen deutlich hyaluronidasehemmenden Effekt (G e r s o n ⁹). Solche wenig analgetisch, dagegen stark hyaluronidasehemmend wirksamen Stoffe zeigen hinsichtlich der therapeutischen Beeinflussung des Rheumatismus die Besonderheit, daß die subjektive Besserung der Beschwerden erst im Verlauf einiger Zeit während oder nach der Behandlung eintritt. Es ist vorläufig nur möglich, den hier vorliegenden Wirkungsmechanismus zu diskutieren, ohne zu endgültigen Schlüssen zu kommen ¹⁴⁻²⁸. Dadurch kommt eine vermehrte Depolymerisation der Hyaluronsäuren und Chondroitinschwefelsäure, die wichtige Bestandteile der Interzellularsubstanz darstellen, zustande. Von mehreren Autoren wird die dadurch erhöhte Permeabilität der Zwischenzellsubstanz als wichtige Ursache des Krankheitsgeschehens angesehen ^{14,15,27,29-31}. Die vermehrte Hyaluronidaseaktivität wird durch hyaluronidasehemmende Substanzen wieder

auf ein normales bzw. erträgliches Maß gesenkt, wodurch sekundär die pathologischen Verhältnisse der Zwischenzellsubstanz normalisiert werden. Wenn auch die hyaluronidasehemmende Wirkung der bisher von M a t h i e s ¹⁻⁷ und Mitarbeitern ⁸⁻¹¹ untersuchten Substanzen sehr rasch eintritt, ist es möglich, daß die subjektive Besserung erst nach langer Zeit sichtbar wird, da der Rückgang der pathologischen Gewebsveränderungen, die als Folge der vermehrten Depolymerisation der Interzellularsubstanz eingetreten sind, längere Zeit benötigt.

Im Rahmen dieser Überlegungen war es interessant, das Chloroquin (Resochin) zu untersuchen, das in letzter Zeit in zunehmendem Maße zur Behandlung des Rheumatismus eingesetzt wird. Nach den bisherigen klinischen Erfahrungen besitzt Chloroquin keine analgetische Wirkung. Aus den bisher vorliegenden experimentellen Untersuchungen konnte nicht entnommen werden, daß eine hyaluronidasehemmende Wirkung des Chloroquins untersucht worden ist. Die klinische Entdeckung der antirheumatischen Wirkung des Resochins dürfte insofern eine zufällige gewesen sein, als P a g e ³² Patienten, die an Malaria litten und zufällig an Gelenkrheumatismus erkrankt waren, mit dem ursprünglich als Malaria-mittel bekannten und dem Chloroquin verwandten Quinacyrin (Atebrin) behandelte. Später setzte er seine Versuche mit Quinacyrin und Chloroquin fort. Es liegen zahlreiche Veröffentlichungen über klinische Erfolge in der Behandlung von Krankheiten des rheumatischen Formenkreises und anderer sog. Kollagenkrankheiten vor. Auch hat es nicht an Versuchen gefehlt, die Wirkungsweise des Chloroquin beim Rheumatismus zu erklären. Alle bisherigen Anschauungen hierüber dürften vorläufig als Hypothesen zu betrachten sein. Auffällig ist dabei, daß der Bedeutung der Zwischenzellsubstanz beim Angriffspunkt des Chloroquin eine besondere Bedeutung zugewiesen wird. H a y d u ³³ nimmt an, daß Chloroquin als Hemmstoff der Adenosintriphosphatase wirkt und auf diese Weise dem erhöhten Bedarf der rheumatischen Gewebe an Adenosintriphosphat Rechnung trägt.

K u r n i c k (zit. B a g n a l l) ³⁴ macht darauf aufmerksam, daß, wenn Chloroquin oder das chemisch verwandte Quinacyrin einem System zugesetzt wird, das auf das Erythematodeszellphänomen positiv reagiert, die Reaktion vermieden wird, da die Substanzen mit polymerisierter Desoxyribonukleinsäure eine feste Kombination bilden und daher von der Desoxyribonuklease nicht aufgebaut werden können. Eine eventuelle

Erklärung durch Unterdrückung der chronischen Infektion, die dem Rheumatismus zugrundeliegt, durch Chloroquin wird von B a g n a l l ³⁴ abgelehnt. B u s c h ³⁵ hebt hervor, daß Chloroquin vermutlich die pathologischen Primärprozesse in der Grundsubstanz hemmt, und betont damit die anfänglich erwähnte Bedeutung der Normalisierung der Verhältnisse der Zwischenzellsubstanz. Es ist die Frage, ob man die häufig geäußerte Auffassung teilen soll, daß Chloroquin anders wirkt als alle anderen Antirheumatika. Die Tatsache, daß der Beginn der klinischen Besserung erst nach einer langen Latenzzeit auftritt, erweckte besonderes Interesse an der Prüfung der hyaluronidasehemmenden Wirkung dieses Stoffes. Falls in den hier vorgelegten Untersuchungen eine hyaluronidasehemmende Wirkung gefunden werden könnte, würde dieses zu einer Erklärung des Wirkungsmechanismus oder eines Teileffektes desselben beitragen.

Es wurde deshalb mit einer von M a t h i e s ²⁻⁷ und Mitarbeitern ⁸⁻¹¹ bereits mehrfach beschriebenen Methodik die hyaluronidasehemmende Wirkung des Chloroquins nach einmaliger sowie nach länger dauernder Applikation und in längeren Zeiträumen nach Absetzen des Mittels untersucht.

Eigene Versuche

Methodik

Als Kriterium der Hyaluronidaseaktivität wurde die Ausbreitung einer Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel verwandt und zwar auf der mit Pilca enthaarten Bauchhaut von männlichen weißen Ratten mit dem Anfangsgewicht (vor Versuchsbeginn) zwischen 120 und 170 g und einem Endgewicht (nach Ende der Versuche) von 180 bis 280 (350) g. Die reine Farbstoffquaddel wurde mit 0,1 ccm einer 0,6%igen Evansblau-Stammlösung streng intracutan gesetzt. Zur Bereitung der Farbstoff+Hyaluronidase-Lösung wurden in 2 ccm der oben genannten Endverdünnung der Farbstofflösung 150 IE Hyaluronidase (Kinetin) gelöst, d.h. daß in der intracutanen Injektion von 0,1 ccm 7,5 IE Hyaluronidase enthalten waren. Ausgewertet wurde die 10 Minuten nach Injektion erreichte Ausbreitung der Farbstoff-Flecken und zwar so, daß deren Konturen auf Zelluloidstreifen übertragen und anschließend planimetrisch ausgemessen wurden.

Eine möglichst genaue Injektion und Messung der Ausbreitung wurde nur bei völliger Ruhe der Tiere erreicht. Zu diesem Zweck wurde jedes Tier

durch subcutane Injektion einer frischen 10%igen Evipan-Natrium-Lösung narkotisiert, wobei 15 mg Evipan-Natrium/100 g Tier zu einer zufriedenstellenden Narkosetiefe führten. Ein Einfluß von Barbituraten auf die Aktivität der Hyaluronidase besteht nach Wi l - h e l m i ³⁶ nicht.

Versuchsreihe 1 (Kurzzeitversuche)

Es wurden an 15 Ratten vor dem Versuch die reine Farbstoff- und die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gesetzt und das Ergebnis nach 10 Minuten abgelesen. Anschließend wurden 10 mg Chloroquin (Resochin, Farbenfabriken Bayer)/100 g Tier subcutan verabreicht und nach 30, 50, 70, 90 Minuten und 1 Woche erneut je eine Farbstoff- und eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gesetzt und jeweils nach 10 Minuten abgelesen und bestimmt.

Die Versuchszeiten 30, 50 Minuten und 1 Woche (Versuchsreihe 1a) bzw. 70 und 90 Minuten (Versuchsreihe 1b) wurden an verschiedenen Tieren bestimmt. Die geeignete Chloroquin-Dosis wurde in Vorversuchen ermittelt. Geprüft wurden die Dosen 60 mg - 10 mg/100 g Tier intraperitoneal, wobei sämtliche Tiere innerhalb von 20 Minuten ad exitum kamen. Subcutan wurde Chloroquin bis 10 mg/100 g Tier vertragen und in dieser Menge und Applikationsform auch beim Kurzzeitversuch verwandt. Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 1 und 2 hervor.

Versuchsreihe 2 (Langzeitversuche)

Bei 15 Tieren wurde zunächst eine reine Farbstoff- und Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gesetzt. Nach 24 Stunden wurden anfangs täglich 10 mg Chloroquindiphosphat (Farbenfabriken Bayer)/100 g Ratte mit Schlundsonde peroral im Aetherrausch verabreicht. Die Dosis mußte jedoch nach einer Woche herabgesetzt werden, da eine große Anzahl der Tiere einging. Sie wurde daraufhin zunächst auf 1,2 mg/100 g Tier festgelegt. Zugleich wurden 5 neue Tiere dem Versuch eingereiht.

Ab der 5. Woche bei den alten Tieren und ab der 4. Woche bei den 5 neuhinzugekommenen Tieren wurden dann 3 mg Chloroquin/100 g Tier täglich peroral verabreicht. Daraus ergab sich folgende Dosierung bei den einzelnen Tieren: Den Tieren von Nr. 1-4 und Nr. 91 wurde verabreicht pro 100 g Tier täglich per Schlundsonde in der

Tier Nr.	Tier- Gew.	Leerquaddel		Quaddel n. 30'			Quaddel n. 50'			Quaddel nach 8 Tagen Pause			
		F ₀	FH ₀	F ₁	FH ₁	F ₂	FH ₂	F ₈	F _{M8}	FH ₈	FH _{M8}		
I	220	135	234	133	189	123	157	119	122	235	226		
II	190	113	240	125	188	117	173	125	127	218	227		
III	200	147	236	120	202	122	171	114	108	237	237		
IV	230	140	280	116	159	118	177	140	115	217	232		

Tabelle 1
Versuchsreihe Ia

Tier Nr.	Tier- Gewicht	Leerquaddel		Quaddel n. 70' Resochin subcutan		Quaddel n. 90' Resochin subcutan	
		F ₀	FH ₀	F ₁	FH ₁	F ₂	FH ₂
6	240	122	222	105	210	118	188
7	230	135	204	111	202	114	189
8	180	113	205	-	177	110	181
9	230	110	199	109	166	110	178
10	170	126	224	119	200	118	212
11	210	116	258	123	207	119	221

Tabelle 2
Versuchsreihe 1b

1. Woche 10 mg Chloroquin, in der 2., 3., 4. und 5. Woche 1,2 mg, in der 6., 7. und 8. Woche 3 mg Chloroquin.

Den Tieren Nr. 60, 72, 74, 79, 101 (neuhinzugekommene) wurde ebenso verabreicht im 1. Monat 1,2 mg, im 2. und 3. Monat 3 mg Chloroquin.

a) Nach 1 Monat Chloroquinverabreichung bei 11 Tieren wurde die Farbstoff- und Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel wiederholt, des weiteren 1 Tag, 1 Woche und 4 Wochen nach zweimonatiger Chloroquinverabreichung (s. Tabelle 3).

b) Bei einer Reihe von 4 Tieren erfolgte die Messung 1 Tag nach einmonatiger, 1 Tag nach zweimonatiger und 1 Woche und 4 Wochen nach dreimonatiger Chloroquingabe (s. Tabelle 4).

Versuchsreihe 3 (Leerversuche)

Daneben lief ein Leerversuch mit 13 Tieren, die am Anfang, nach 4 und nach 8 Wochen ohne Medikamentenapplikation gequaddelt wurden (Ergebnisse siehe Tabelle 5).

Berechnung der prozentualen Hemmung

Die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität wurde zunächst in Prozenten ausgedrückt. Dieser Berechnung wurde zugrundegelegt, daß die Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddel vor dem Versuch (Fv) einer 100%igen Hemmung entspricht, da eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel mit vollständig gehemmter Hyaluronidaseaktivität die gleiche Größe hätte. Die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor dem Versuch (FHv), also ohne Einwirkung einer hyaluronidasehemmenden Substanz entspricht einer 0%igen Hemmung. Daraus läßt sich die prozentuale Hemmung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel durch die Chloroquingabe zu den bestimmten Zeiten nach Injektion (Fhn) nach der Formel

$$\frac{(FHv - Fhn) \cdot 100}{FHv - Fv} = \text{Hemmung in \%}$$

errechnen. Die reine Farbstoffquaddel zu den bestimmten Zeiten nach der Chloroquingabe wurde gesetzt, um einen etwaigen Einfluß auf die reine Farbstoffquaddel erkennen zu können.

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

A) Resochinversuch

Bei den Langzeitversuchen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, und

Tier Nr.	Leerquaddel 19.3.					Quaddel n. einmonatiger Fütterung mit Resochin (1 Tag Pause) 16.4.					Quaddel nach 9 Wochen (8 Wochen tgl. Fütterung + 1 Woche Pause) 21.5.					Quaddel nach 12 Wochen (Fütterung: 8 Wochen tgl. + 4 Wochen Pause) 12.6.				
	Tier- Gew.	F _o	F _{Mo}	FH _o	FH _{Mo}	Tier- Gew.	F ₁	F _{M1}	FH ₁	FH _{M1}	Tier- Gew.	F ₂	F _{M2}	FH ₂	FH _{M2}	Tier- Gew.	F ₃	F _{M3}	FH ₃	FH _{M3}
8	120	114 115	115	220 235	228	220	101 128	115	185 190	188	235	138 130	134	227 194	211	260	139 162	150	238 243	
9	135	143 149	146	250 265	258	145	138 137	138	210 216	213	160	134 149	141	195 249	222	190	144 135	139	264 243	253
12	140	126 102	114	246 220	233	230	129 128	129	159 164	162	205	155 112	133	195 225	210	200	128 133	130	219 237	228
22	145	115 134	125	250 256	253	235	140 116	128	224 207	216	265	128 133	130	220 216	218	280	128 157	142	248 226	237
26	132	126 121	124	207 248	228	180	112 125	119	168 173	171	190	136 113	124	202 181	191	250	138 151	144	232 257	244
28	145	131 135	133	236 238	237	180	125 122	124	199 171	185	185	118 117	118	205 203	204	220	158 161	159	256 250	253
32	136	131 109	121	258 237	248	210	128 128	128	182 207	195	220	123 136	129	203 213	208	240	131 123	127	224 247	235
33	135	114 134	124	245 253	249	230	128 123	125	160 162	161	250	140 122	131	209 200	204	260	133 150	141	215 218	216
45	140	105 157	131	286 270	278	145	126 -	126	182 240	211	160	155 141	148	220 219	219	190	156 164	160	254 264	259
49	130	123 110	117	228 247	238	140	130 117	123	206 183	195	160	131 143	137	221 206	213	180	121 142	131	234 272	253
91	150	122 154	138	248 246	247	202	120 114	117	200 170	185	195	137 150	143	227 203	215	210	138 144	141	208 232	220

T a b e l l e 3
Versuchsreihe 2 a

Nr.	Leerquaddel		Quaddel n. 8 Wochen tgl.				Quaddel n. 12 Wo. tgl.				Quaddel n. 12 Wo. tgl.			
	Tier Gew.	F ₀	F _{Mo}	F ₀ FH ₀ Mo	Fütterung mit Resochin (1 Tag Pause) 28.4.	Tier F ₁ FH ₁ M ₁ Gew.	F ₂ F _{M2} FH ₂ M ₂	Tier F ₂ F _{M2} FH ₂ M ₂ Gew.	Fütterung mit Resochin (1 Tag Pause) 23.5.	Tier F ₃ F _{M3} FH ₃ M ₃ Gew.	Fütterung mit Resochin + 1 Woche Pause. 1.7.	Tier F ₄ F _{M4} FH ₄ M ₄ Gew.	Fütterung mit Resochin + 4 Wochen Pause. 21.7.	Tier F ₄ F _{M4} FH ₄ M ₄ Gew.
60	152	123 104	114	214 223	230	121 125	123 125	124 127	192 162	177 162	148 157	213 208	128 138	212 219
72	160	136 124	130	253 229	190	149 107	128 107	133 129	195 169	182 169	150 145	210 237	151 145	246 241
79	165	136 126	131	252 259	250	130 105	117 105	105 124	190 178	184 178	145 148	212 213	134 139	231 242
101	172	160 135	148	227 224	230	130 137	133 137	110 109	183 175	179 175	139 149	204 217	139 147	228 215

T a b e l l e 4
Versuchsreihe 2 b

Tier Nr.	Versuchsbeginn					4 Wochen nach Versuchsbeginn					8 Wochen nach Versuchsbeginn					Tier- Gew.
	Tier- Gew.	F _o	F _{Mo}	FH _o	FH _{Mo}	F _i	F _{M1}	FH ₁	FH _{M1}	He ₁ %	F ₂	F _{M2}	FH ₂	FH _{M2}	He ₂ %	
1	130	131 139	135	256 260	258	145 135	140 135	261 251	256	1,67	150 153	112	260 251	256	1,67	240
3	140	138 130	134	246 242	244	135 127	131 127	253 245	249	-4,5	137 134	136	240 233	237	6,40	245
4	150	131 140	136	258 263	261	138 130	134 130	250 253	252	7,2	134 140	138	255 251	253	6,40	330
5	150	125 134	129	331 222	227	130 130	130 130	235 227	231	-4,08	133 129	131	230 239	235	-8,16	260
6	150	127 130	129	235 229	232	128 138	133 138	236 244	240	-7,77	134 130	132	236 227	232	0,00	305
7	160	139 136	138	254 252	253	138 138	138 138	249 239	244	7,83	146 137	142	243 250	247	5,22	330
8	150	124 119	122	220 228	224	128 130	129 130	228 235	232	-7,84	128 123	126	231 221	226	-1,96	240
9	140	143 139	141	245 240	243	136 133	135 133	237 241	239	6,67	140 144	142	239 241	240	5,71	230
10	125	156 158	157	258 264	261	149 148	149 148	260 266	263	-1,92	146 138	142	262 258	260	0,96	285
11	145	157 148	153	267 268	268	146 147	147	254 259	257	9,56	153 152	153	270 261	266	1,74	265
12	155	120 127	124	220 -	220	122 129	126 129	213 208	211	9,31	127 128	128	220 229	225	-5,20	260
13	135	140 138	139	253 250	252	132 130	131 130	250 268	259	-6,20	135 139	137	254 244	249	2,65	250

Tabelle 5
(Versuchsreihe 3)

zwar in der Weise, daß jeweils 2 Farbstoff-Quaddel und 2 Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln bei dem gleichen Versuchstier gesetzt wurden. Die Abweichungen zwischen den Meßwerten zweier am gleichen Tier bestimmter analoger Quaddeln liefern einen Schätzwert für den experimentellen Fehler. Allerdings enthält dieser Fehler auch eine biologische Komponente, da aus technischen Gründen die Quaddeln an verschiedenen Stellen der Bauchhaut des Tieres gesetzt werden mußten. In den Unterschieden zwischen den Meßwerten analoger Quaddeln am gleichen Tier können demnach auch noch lokale Unterschiede in der Permeabilität der Haut dieses Tieres zum Ausdruck kommen.

Bei den Kurzzeitversuchen können aus prinzipiellen Gründen keine Doppelbestimmungen durchgeführt werden, da die Größe der Bauchhaut der Tiere es nicht gestattet, innerhalb eines kürzeren Zeitraumes mehr als 6 Quaddeln zu setzen.

Der statistischen Auswertung unserer Versuchsergebnisse legten wir lineare statistische Modelle zugrunde, deren Struktur durch die jeweilige Fragestellung bestimmt war. Grundsätzlich gingen wir hierbei von der Annahme aus, daß die Änderung eines Quaddel-Typus (reine Farbstoff-Quaddel bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel) von einem Bestimmungszeitpunkt zum anderen eine im wesentlichen von den Versuchstieren unabhängige Größe ist. Die Abweichung der individuellen Meßwerte der Tiere von dieser Hypothese sahen wir als zufallsbedingt an und erblickten hierin einen Ausdruck der biologischen Variabilität zwischen den Tieren.

Zur Entscheidung der Frage, ob ein Quaddel-Typus im Verlaufe der Versuche eine statistisch wesentliche Änderung erfährt, führten wir mehrfache Varianz-Analysen durch, denen das jeweilige lineare statistische Modell zugrunde lag. Bei den Langzeitversuchen berücksichtigten wir hierbei die Tatsache, daß Doppelbestimmungen für die einzelnen Zeitpunkte vorlagen. Das Ergebnis der Varianz-Analysen findet sich in den Tabellen 6-9.

Es bedeutet in den Schemata der Varianz-Analysen jeweils n die Zahl der Freiheitsgrade, SAQ das Summen-Abstands-Quadrat und MAQ das Mittlere-Abstands-Quadrat der jeweiligen Varianz-Komponente. Die Bedeutung der mit $F_{emp.}$ und mit p überschriebenen Spalten wird weiter unten erklärt werden.

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	133	44	-	
Zwischen Zeiten	3	589	196	1,94	-
Tiere - Zeiten	9	906	101		
Gesamt-Varianz	15	1.628	109		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	286	95	-	
Zwischen Zeiten	3	16.404	5.468	20,25	0,1%
Tiere - Zeiten	9	2.434	270		
Gesamt-Varianz	15	19.124	1.275		

T a b e l l e 6
(Versuchsreihe 1a)

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	399	80	2,10	-
Zwischen Zeiten	2	208	104	2,74	-
Tiere - Zeiten	10	380	38		
Gesamt-Varianz	17	987	58		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	4.476	895	8,69	1,0%
Zwischen Zeiten	2	2.388	1.194	11,59	1,0%
Tiere - Zeiten	10	1.032	103		
Gesamt-Varianz	17	7.896	464		

T a b e l l e 7
(Versuchsreihe 1b)

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	9	1.585	176	1,18	-
Zwischen Zeiten	3	3.431	1.143	7,72	0,1%
Tiere - Zeiten	27	3.983	148		
Zwischen Doppelbest.	39	8.999	231		
Innerhalb Doppelbest.	40	5.395	135		
Gesamt-Varianz	79	14.394	182		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	9	6.812	757	3,29	1,0%
Zwischen Zeiten	3	40.061	13.353	51,95	0,1%
Tiere - Zeiten	27	6.202	230		
Zwischen Doppelbest.	39	53.075	1.361		
Innerhalb Doppelbest.	40	11.000	275		
Gesamt-Varianz	79	64.075	811		

T a b e l l e 8
(Versuchsreihe 2a)

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	479	159	1,02	-
Zwischen Zeiten	4	3.941	985	6,27	1,0%
Tiere - Zeiten	12	1.887	157		
Zwischen Doppelbest.	19	6.307	332		
Innerhalb Doppelbest.	20	2.255	113		
Gesamt-Varianz	39	8.562	220		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	1.184	394	2,43	-
Zwischen Zeiten	4	17.120	4.280	26,42	0,1%
Tiere - Zeiten	12	1.948	162		
Zwischen Doppelbest.	19	20.252	1.066		
Innerhalb Doppelbest.	20	2.327	116		
Gesamt-Varianz	39	22.579	579		

T a b e l l e 9
(Versuchsreihe 2b)

Bei den Langzeitversuchen ist die "Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen" die beste Schätzung des experimentellen Fehlers. Es zeigt sich, daß sowohl bei der Farbstoff-Quaddel als auch bei der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel in der Versuchsreihe 2a der experimentelle Fehler etwas größer ist als in der Versuchsreihe 2b (besonders deutlich wird dieses bei der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel). Ob hier ein Dosierungs-Faktor mitspielt oder ob hier lediglich die zunehmende Beherrschung der experimentellen Technik zum Ausdruck kommt, läßt sich nicht entscheiden. Ein plausibler Grund läßt sich allerdings für diese Unterschiede im experimentellen Fehler nicht finden und es erschien uns daher gerechtfertigt, für eine genauere Schätzung des experimentellen Fehlers beide Versuchsreihen zusammen zu betrachten. Als mittlerer Fehler des Mittelwertes einer Doppelbestimmung erhält man dabei für die

$$\text{Farbstoff-Quaddel} \quad \pm \quad 8,0 \text{ mm}^2$$

und für die

$$\text{Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel} \quad \pm \quad 10,5 \text{ mm}^2.$$

Die Kenntnis des experimentellen Fehlers gestattet es zu prüfen, ob das zugrundegelegte lineare statistische Modell den realen Sachverhalt in ausreichender Näherung wiedergibt. In der Größe der Wechselwirkung Tiere - Zeiten kommt die Abweichung zwischen den tatsächlichen Meßwerten und denjenigen Werten, die auf Grund des linearen Modells zu erwarten sind, zum Ausdruck. Ist diese Wechselwirkung nicht größer als der experimentelle Fehler, so kann behauptet werden, daß das zugrundegelegte Modell dem realen Sachverhalt angemessen ist. Die in den Tabellen 8 und 9 wiedergegebenen Varianz-Analysen für die Langzeitversuche zeigen, daß in keinem Falle, weder für die reine Farbstoffquaddel noch für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel, die Wechselwirkung Tiere - Zeiten wesentlich größer ist als der experimentelle Fehler. Damit ist die Wahl des zugrundegelegten statistischen Modells gerechtfertigt.

Aus den soeben geschilderten Ergebnissen, über das Verhältnis des experimentellen Fehlers zur Wechselwirkung Tiere - Zeiten ergibt sich zugleich die Berechtigung, bei den Kurzzeitversuchen die Wechselwirkung von Tiere - Zeiten als Schätzung des Versuchsfehlers anzusehen.

Wir wenden uns nunmehr der Interpretation der Ergebnisse der Varianz-Analysen zu, soweit sie das zeitliche Verhalten der einzelnen Quaddel-Typen betreffen.

Farbstoff-Quaddel. Bei beiden Langzeitversuchen ist die "Varianz zwischen den Zeiten" wesentlich größer als der experimentelle Fehler; der zugehörige Varianz-Quotient $F_{\text{emp.}}$ besitzt eine Überschreitungswahrscheinlichkeit die höchstens 0,1% bzw. 1% beträgt. Es kann daher als statistisch streng gesichert gelten, daß bei beiden Versuchsreihen die reinen Farbstoff-Quaddeln im Verlaufe des Versuches sich wesentlich ändern. Bei dem Kurzzeitversuch ist ein solches Verhalten der reinen Farbstoff-Quaddeln statistisch nicht nachweisbar.

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel. Bei den beiden Langzeitversuchen ist die "Varianz zwischen den Zeiten" statistisch wesentlich größer als der Versuchsfehler. Bei beiden Versuchsreihen besitzt der zugehörige Varianz-Quotient $F_{\text{emp.}}$ eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die nicht größer als 0,1% ist. Es kann somit als statistisch hoch gesichert gelten, daß sich die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln während der Langzeitversuche wesentlich ändern.

Die gleiche Aussage gilt auch für den Kurzzeitversuch, d.h. sowohl für den Teilversuch a als auch für den Teilversuch b. Allerdings ist bei dem Teilversuch a die Überschreitungswahrscheinlichkeit höchstens 1%, d.h. möglicherweise etwas größer als oben, also der Grad der statistischen Sicherung nicht ganz so hoch.

Neben der besten Schätzung des Versuchsfehlers liefert die Varianz-Analyse nur eine generelle Aussage darüber, ob zwischen den einzelnen Zeitpunkten der Bestimmung Unterschiede in der Größe der jeweiligen Quaddel-Typen vorliegen. Sie macht jedoch keine Aussage darüber, zu welchem Zeitpunkt speziell eine Hyaluronidasehemmung auftritt bzw. zu welchem Zeitpunkt speziell die Farbstoff-Quaddel gegenüber ihrem Ausgangswert wesentliche Änderungen aufweist. Um diese Fragen zu entscheiden, war es notwendig, im Anschluß an die Varianz-Analysen einen weiteren Test durchzuführen. Entsprechend den neuesten statistischen Untersuchungen über die simultane Prüfung mehrerer Mittelwertsdifferenzen, entschieden wir uns für die Durchführung des Duncan-Testes.

Bei der Besprechung der statistischen Methodik wurde oben gesagt, daß wir die Änderungen eines Quaddel-Typus von einem Zeitpunkt zum anderen als eine im wesentlichen von den Versuchstieren unabhängige Größe ansehen. Die beste Schätzung für diese Größen erhält man aus der Differenz

zwischen den Mittelwerten, die aus den Meßwerten sämtlicher Tiere zu den betreffenden Zeitpunkten errechnet wurden. In den Tabellen 10-13 sind diese Mittelwerte in der Spalte $\bar{x}$ angegeben. Bei den Langzeitversuchen steht in der Spalte s^2 jeweils die Varianz zwischen zwei zusammengehörigen Doppelbestimmungen, d.h. die Schätzung des experimentellen Fehlers; die dahinter angegebene Spalte $s_{\bar{x}}$ enthält den hieraus berechneten mittleren Fehler des Mittelwertes aus einer Doppelbestimmung. Bei dem Kurzzeit-Versuch enthält die Spalte s^2 die Varianz zwischen den Meßwerten der einzelnen Versuchstiere, sie liefert somit einen Schätzwert für die biologische Variabilität zwischen den Versuchstieren. Die Spalte $\bar{x}_t - \bar{x}_0$ schließlich enthält für jeden Zeitpunkt und jeden Quaddel-Typus die Differenz des zugehörigen Mittelwertes gegenüber dem Mittelwert des Quaddel-Typus vor Beginn des Versuches. Mittels des Duncan-Testes wurde geprüft, ob diese Mittelwertdifferenzen wesentlich von 0 verschieden sind, ist dieses der Fall, so kann mit der in der Spalte p angegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit behauptet werden, daß sich der betreffende Quaddel-Typus zu dem betreffenden Zeitpunkt wesentlich gegenüber seinem Ausgangswert geändert hat. Nur wenn diese Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ist, kann diese Aussage als statistisch gesichert gelten.

In der mit "Hemmung" überschriebenen Spalte der Tabellen 10-13 ist schließlich noch die in üblicher Weise berechnete prozentuale Hyaluronidasehemmung für jeden Zeitpunkt des Versuches angegeben. Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, daß die Änderungen der reinen Farbstoffquaddel während des Versuches zufälliger Natur seien. Dieses trifft allerdings, wie weiter oben bei der Diskussion der Ergebnisse der Varianz-Analyse ausgeführt, für die Langzeitversuche nicht zu.

Die Ergebnisse der beiden Langzeit-Versuche weisen prinzipiell keine großen Unterschiede auf. Prinzipiell wird bei beiden die gleiche Hyaluronidasehemmung, gemessen an der Abnahme der mittleren Quaddelgröße, erzielt, wobei der maximale Effekt bei dem ersten Langzeitversuch etwas früher eintritt als bei dem zweiten. Dieses mag jedoch darauf zurückzuführen sein, daß bei dem ersten Langzeitversuch die Dosierung zunächst erheblich höher war als bei dem zweiten. Bei beiden Versuchen tritt unmittelbar nach Absetzung der Medikation eine erhebliche Verkleinerung der Hemmung d.h. eine Vergrößerung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel auf und 4 Wochen nach Beendigung der Medikation

	N	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}_t - \bar{x}_0$	Hemmung	p
E_v	4	134	215			
H_v	4	247	475			
E_1	4	123	53	-11		
H_1	4	184	330	-63	50,9%	1,0%
E_2	4	120	8	-14		
H_2	4	169	76	-78	63,0%	1,0%
E_3	4	118	68	-16		
H_3	4	230	26	-17	13,7%	5,0%

T a b e l l e 10
(Versuchsreihe 1a)

	N	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}_t - \bar{x}_0$	Hemmung	p
E_v	6	120	86			
H_v	6	219	475			
E_1	6	112	53	- 8		
H_1	6	194	319	-25	24,3%	1,0%
E_2	6	115	17	- 5		
H_2	6	195	307	-24	23,2%	1,0%

T a b e l l e 11
(Versuchsreihe 1b)

	N	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}_t - \bar{x}_0$	Hemmung	p
E _v	10	125	154,7	8,8			
H _v	10	242	185,9	9,6			
E ₁	10	124	85,8	6,5	- 1		
H ₁	10	187	372,1	13,6	-55	49,4%	1,0%
E ₂	10	132	175,0	9,3	- 7		5,0%
H ₂	10	210	317,4	12,6	-32	28,8%	1,0%
E ₃	10	140	124,2	7,9	+15		1,0%
H ₃	10	238	224,7	10,6	- 4	3,1%	-

T a b e l l e 12
(Versuchsreihe 2a)

	N	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}_t - \bar{x}_0$	Hemmung	p
E _v	4	130	153,7	8,8			
H _v	4	235	89,5	6,7			
E ₁	4	125	306,7	12,4	- 5		
H ₁	4	194	108,5	7,4	-41	40,0%	1,0%
E ₂	4	120	48,5	4,9	-10		5,0%
H ₂	4	180	223,0	10,5	-55	53,3%	1,0%
E ₃	4	148	27,0	3,7	+18		1,0%
H ₃	4	214	115,5	7,6	-21	20,4%	1,0%
E ₄	4	140	28,2	3,8	+10		
H ₄	4	229	45,5	4,8	- 6	5,7%	-

T a b e l l e 13
(Versuchsreihe 2b)

liegt überhaupt keine Hemmung mehr vor. Hinsichtlich des Verhaltens der reinen Farbstoffquaddel ist interessant, daß bei beiden Versuchsreihen eine Vergrößerung der reinen Farbstoffquaddel erst nach Absetzen der Medikation eintritt. Hier ist das Verhalten der beiden Versuchsreihen insofern etwas unterschiedlich, als die Farbstoffquaddel bei der Versuchsreihe 2a ihren größten Wert 4 Wochen nach Absetzen der Medikation annimmt, während bei der Versuchsreihe 2b der größte Wert unmittelbar nach Beendigung der Medikation auftritt, während 4 Wochen danach die Farbstoffquaddel praktisch auf ihren Ausgangswert zurückgegangen ist. Ob hierin eine Erhöhung der Permeabilität der Haut als Reaktion gegen die starke Hyaluronidasehemmung zum Ausdruck kommt, könnte eventuell zur Diskussion gestellt werden.

Bei dem Kurzzeitversuch fällt auf, daß nach einer zunächst erheblichen Hyaluronidasehemmung praktisch innerhalb von 20 Minuten wieder eine gesteigerte Hyaluronidaseaktivität auftritt, das jedoch noch nach 8 Tagen eine schwach gesicherte Hemmung vorliegt. Obschon die Änderungen der reinen Farbstoffquaddeln bei diesem Versuch statistisch nicht zu sichern waren, ist dennoch interessant zu beobachten, daß diese während des reinen Kurzzeitversuches annähernd parallel zu den Änderungen der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel verlaufen. Der kleinere Wert 8 Tage nach Beendigung des Versuches mag andere Ursachen haben.

B) Vergleichsversuche (Leerversuche)

Als Grundlage zur Beurteilung der Ergebnisse von Langzeitversuchen über die hyaluronidasehemmende Wirkung bestimmter Substanzen (Antirheumatica) wurde ein Langzeitversuch an unbehandelten normalen Ratten durchgeführt.

Ziel der statistischen Analyse war es zu prüfen, ob die Ausbreitung beider Quaddeltypen über den gesamten Zeitraum des Versuches hinweg als konstant angesehen werden kann.

Der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde ein entsprechendes lineares Modell zugrundegelegt, wie es auch bei der Auswertung der Versuche über die Hyaluronidasehemmung bei Medikation zur Anwendung gelangte. Es war jedoch in diesem Falle nicht notwendig, die Farbstoffquaddel und die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel getrennt zu behandeln, da die Prüfhypothese impliziert, daß die beiden Quaddeltypen sich vollkommen gleichartig verhalten.

Entsprechend dem zugrundegelegten linearen Modell, erfolgte die Auswertung mittels einer mehrfachen Varianz-Analyse. Die hierbei ermittelten Varianz-Komponenten der Gesamt-Varianz, sowie die Zahl der ihnen zukommenden Freiheitsgrade sind in der Tabelle 14 in der üblichen Form zusammengestellt. Die Ergebnisse der Varianz-Analyse sind wie folgt zu interpretieren.

- a) der Mittelwert von 2 zusammengehörigen Einzelbestimmungen ist mit einem mittleren Fehler behaftet, der sich aus der Varianz zwischen diesen beiden Einzelbestimmungen schätzen läßt. Eine genauere Schätzung dieses mittleren Fehlers erhält man, wenn man alle 72 Doppelbestimmungen berücksichtigt und annimmt, daß der mittlere Fehler innerhalb aller Doppelbestimmungen gleich ist. Eine unabhängig von der Varianz-Analyse durchgeführte Prüfung dieser Annahme mittels des Bartlett-Tests ergab, daß die Meßergebnisse dieser Annahme nicht widersprechen. Die in der Varianz-Analyse angegebene "Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen" stellt somit die beste, aus den Versuchsergebnissen zu gewinnende Schätzung der Varianz zwischen zusammengehörigen Einzelbestimmungen dar. Aus ihr ergibt sich als mittlerer Fehler des Mittelwertes $\bar{x}$ einer Doppelbestimmung der Wert $\pm 3,5 \text{ mm}^2$. Als Vertrauensintervall von $\bar{x}$ folgt hieraus $\bar{x} \pm 7,05 \text{ mm}^2$.
- b) Die Abweichung der empirischen Ergebnisse von den Hypothesen, die dem linearen Modell zugrundeliegen, drücken sich in der Varianz-Analyse in den Wechselwirkungen "Tiere-Zeiten", "Tiere-Quaddeltypen", "Zeiten-Quaddeltypen" und der "Rest-Varianz" aus. Der Vergleich dieser Wechselwirkungen mit dem experimentellen Fehler (Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen) nach dem Varianz-Quotienten-Test, ergibt nur für die Wechselwirkung zwischen Tieren und Quaddeltypen einen Varianz-Quotienten $F_{\text{emp.}}$, dessen Größe nicht mehr als zufallsbedingt angesehen werden kann. (Überschreitungswahrscheinlichkeit $p = 0,1\%$). Die Änderungen welche die Quaddeln von einem Bestimmungszeitpunkt zum anderen erfahren, können somit als unabhängig vom Versuchstier und vom Typus der Quaddel angesehen werden. Dagegen ist der Unterschied zwischen den beiden Quaddeltypen wesentlich von dem jeweiligen Versuchstier abhängig.
- c) Die mittlere Änderung, welche die Größe der Quaddeln von einem Zeitpunkt zum anderen erfährt, und die wie oben bemerkt, von den Versuchstieren und dem Typus der Quaddeln unabhängig ist, drückt sich

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	11	11.420	1.038		0,1%
Zwischen den Zeiten	2	4	2		-
Zwischen den Quaddel-Typen	1	434.501	434.501		0,1%
Tiere - Zeiten	22	890	40	1,60	-
Tiere - Quaddel-Typen	11	1.499	136	5,44	0,1%
Zeiten - Quaddel-Typen	2	96	48	1,92	-
Rest-Varianz	22	565	26	1,00	-
Zwischen Doppelbestimmung	71	448.975	6.324		
Innerhalb Doppelbestimmung	72	1.802	25		
Gesamt-Varianz	143	450.777	3.152		

T a b e l l e 14

	N	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$
E ₀	12	136	18,4	1,24
H ₀	12	247	16,4	1,17
E ₁	12	135	19,8	1,28
H ₁	12	247	36,1	1,73
E ₂	12	137	29,2	1,56
H ₂	12	245	30,1	1,58

Tabelle 15

in der "Varianz zwischen den Zeiten" aus. Diese ist zahlenmäßig wesentlich kleiner als der experimentelle Fehler, d.h. die Änderungen der Quaddelgrößen im Verlaufe des Versuches liegen vollkommen in dem Bereich des experimentellen Fehlers. Die vorliegenden Versuche berechtigen somit zu dem Schluß, daß sich im Verlaufe des Beobachtungszeitraumes die Diffusionsgeschwindigkeit weder bei der Farbstoff- noch bei der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel geändert haben.

Zur Beurteilung dieses Ergebnisses ist es vielleicht von Bedeutung zu bemerken, daß in dem gleichen Zeitraum die Tiere eine wesentliche Gewichtszunahme erfahren haben, deren Betrag im Mittel $132 \pm 5,6$ g betrug.

- d) Die gesicherte Wechselwirkung zwischen Tieren und Quaddeltypen bringt zum Ausdruck, daß der Unterschied zwischen der Größe der Farbstoff- und der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vom Versuchstier abhängig ist. Eine orientierende Untersuchung dieses Sachverhaltes durch Berechnung der Regression zwischen Farbstoffquaddeln und den Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln zeigte, daß der Unterschied zwischen den beiden Quaddel-Typen annähernd linear mit der Größe der Farbstoffquaddel wächst. Eine eingehende Untersuchung wurde an dieser Stelle wegen des für diese Frage geringen Stichprobenumfanges unterlassen, und soll später, bei Vorliegen weiterer Beobachtungen, vorgenommen werden.

In Tabelle 15 ist für jeden Bestimmungszeitpunkt der Mittelwert $\bar{x}$, die Varianz s^2 zwischen zusammengehörige Einzelmessungen und der sich hieraus ergebende mittlere Fehler $s_{\bar{x}}$ des Mittelwertes einer Doppelbestimmung angegeben. Der Vergleich der Varianzen s^2 mittels des Bartlett-Tests ergab bei $n = 5$ Freiheitsgraden einen Wert $\chi^2_{\text{emp.}} = 3,035$, dem eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von höchstens 50% zukommt. Die Varianzen s^2 , welche die Größe des experimentellen Fehlers zum Ausdruck bringen, können daher als vom Zeitpunkt ihrer Bestimmung und vom Typus der Quaddeln unabhängig angesehen werden.

Diskussion

Die Ergebnisse der Versuchsreihe 1 zeigen einen deutlichen hyaluronidasehemmenden Effekt nach subcutaner Applikation von 10 mg Chloroquin

/100 g Ratte. Die auffallende und statistisch zu sichernde Verminderung der Ausbreitung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zeigt eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität. Diese zeigt ihr Maximum 50 Minuten nach Chloroquin-Injektion. 7 Tage nach der Injektion ist noch eine schwach gesicherte Hemmung der Hyaluronidaseaktivität vorhanden.

Besonders im Hinblick auf die Dauerwirkung des Chloroquins wurden die weiteren Versuchsreihen mit einer über 2-3 Monate fortgeführten oralen Applikation durchgeführt. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß während dieser Zeit unterschiedliche Dosen verabreicht werden mußten, da sich erst im Verlauf der Versuche die Unverträglichkeit der anfangs zu hoch gewählten Dosis herausstellte. Es sind damit keine Aussagen über die Dosisabhängigkeit des Ausmaßes der Wirkung möglich. Es zeigt sich, daß nach einer oralen Medikation von einem bzw. zweimonatiger Dauer (Messung 24 Stunden nach der letzten Applikation) eine Hyaluronidasehemmung etwa der gleichen Größenordnung wie nach einmaliger subcutaner Gabe zu registrieren ist. Eine Woche nach der zwei Monate dauernden oralen Gabe ist die Hyaluronidasehemmung bereits auf etwas weniger als die Hälfte ihres Anfangswertes (24 Stunden nach zweimonatiger Gabe) abgesunken, um nach weiteren 3 Wochen mit 3,1% nicht mehr deutlich zu sein. Das Ausmaß der Hyaluronidasehemmung direkt nach dreimonatiger Applikation wurde nicht bestimmt. Die Werte 1 bzw. 4 Wochen nach 3 Monate dauernder Applikation zeigen gegenüber den Tieren, denen 2 Monate lang Chloroquin verabreicht wurde, keine Abnahme der Hyaluronidasehemmung bei fortdauernder Applikation, wie dieses nach Untersuchungen von S c h w a n k ⁴² mit Chloraethylbenzmethoxazon vielleicht zu vermuten gewesen wäre. Versuche, die dieses Phänomen auch am Beispiel des Chloroquins eindeutig klären, wären mit Gaben über längere Zeiträume durchzuführen. Nach einer 1 Monat dauernden Serie von jeden 2. Tag durchgeführten Moorbädern bei Ratten zeigte es sich, daß auch 4 Wochen nach dem letzten Bad fast noch die volle Hyaluronidasehemmung vorhanden ist. Da keine Versuche mit einer zweimonatigen Moorbaderie vorliegen, ist auch hier ein eindeutiger Vergleich nicht möglich, so daß entsprechende Versuche ebenfalls anzuregen wären. Sicher ist, daß nach Absetzen der Chloroquinmedikation die Hyaluronidasehemmung relativ schnell abzunehmen scheint. Das zeigen besonders Versuche von P r o b s t ³⁷, nach denen z.B. 41 Tage nach dreimonatiger Acetylsalicylsäure (Aspirin)-Medikation noch eine deutlich statistisch zu sichernde Hyaluronidase-

hemmung nachweisbar ist.

Das Ausmaß der reinen Farbstoffquaddel im Langzeitversuch der 2. Versuchsreihe zeigt eine mäßige Vergrößerung des Farbstoff-Fleckes gegenüber dem Ausgangswert. Dieser Effekt wird jedoch erst nach Absetzen der Medikation deutlich. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann vorläufig nicht gegeben werden.

Die Vergleichsversuche an unbehandelten Tieren zeigen, daß eine Veränderung der Hyaluronidaseaktivität über längere Zeiträume nicht festgestellt werden kann, und daß auch bei einer Gewichtszunahme der Tiere keine methodischen Fehler durch abweichende Größenverhältnisse der Farbstoff-Flecken auftreten.

Es ist durch die vorliegende Arbeit erwiesen worden, daß Resochin eine hyaluronidasehemmende Substanz darstellt und seine Wirkung auf das rheumatische Geschehen zumindest teilweise auf diesen Effekt zurückgeführt werden kann. Da, wie eingangs aufgeführt, bisher sämtliche in der Rheumatherapie angewandten Stoffe und Behandlungsmethoden eine hyaluronidasehemmende Wirkung besitzen, kann nach unseren Versuchen nicht ohne weiteres ein besonderer Wirkungsmechanismus abgeleitet werden, zumal wir im Fall der Moorbäder andere Behandlungsmethoden kennen, die ebenfalls keinen analgetischen, dafür aber einen stark hyaluronidasehemmenden Effekt zeigen. Jedenfalls glauben wir nicht, daß im Chloroquin ein Mittel zur Verfügung steht, dem ein grundsätzlich anderer Wirkungsmechanismus zugrundeliegt. Die von B u s c h ³⁵ hervorgehobene Hemmung der pathologischen Primärprozesse in der Grundsubstanz wird auch mit sämtlichen anderen antirheumatisch wirksamen Stoffen erzielt, indem diese die gesteigerte Hyaluronidaseaktivität hemmen. Neben der von B a g n a l l ³⁴ erwähnten Annahme, daß Cortison eine unspezifische, entzündungswidrige Wirkung hat, hat S c h l i e r f ¹⁰ zeigen können, daß auch die Glukokortikoide eine hyaluronidasehemmende Wirkung entfalten, die wie alle anderen von M a t h i e s ¹⁻⁷ und Mitarbeitern ⁸⁻¹¹ untersuchten Substanzen über eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark wirken. B a l l a b i u und A m i r a ³⁸ diskutieren auf Grund ihrer Literaturstudien unter anderem eine Wirkung auf die Gewebsreaktion mit oder ohne Beteiligung der Hypophyse. In den bisherigen Versuchen fanden M a t h i e s ¹⁻⁷ und Mitarbeiter ⁸⁻¹¹, daß die hyaluronidasehemmende

Wirkung weder an eine Mitwirkung der Hypophyse noch an eine solche der Nebennierenrinde gebunden ist. Durch Versuche von D o m e n j o z ³⁹, M a t h i e s ⁴⁰ und J u n g ⁴¹ wurde gezeigt, daß die von ihnen geprüften Substanzen zwar eine Aktivierung der Rindentätigkeit bedingen, die jedoch für das Auftreten der Hyaluronidasehemmung nicht maßgebend ist, natürlich mit Ausnahme der Glukokortikoide. Im Fall des Resochin wurden diese Untersuchungen bisher nicht durchgeführt, es besteht jedoch vorläufig keine Veranlassung, einen anderen Wirkungsmechanismus als den über das Nebennierenmark, zumindest hinsichtlich des hyaluronidasehemmenden Effektes, anzunehmen.

Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, daß Chloroquin (Resochin) eine hyaluronidasehemmende Wirkung besitzt, die ihr Maximum 50 Minuten nach subcutaner Injektion zeigt und die 7 Tage nach der Applikation noch in geringem Ausmaß sichtbar ist. In Langzeitversuchen bei ein- bis dreimonatiger täglicher oraler Applikation mit aus technischen Gründen allerdings unterschiedlicher Dosierung wurde festgestellt, daß nach Absetzen der Medikation die hyaluronidasehemmende Wirkung relativ rasch zurückgeht. Eine Abnahme des hyaluronidasehemmenden Effektes bei längerer Applikation konnte in den untersuchten Zeiträumen nicht festgestellt werden. Der Wirkungsmechanismus des Chloroquins wird unter Heranziehung der vorliegenden Literatur diskutiert.

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H.: Med. Klin. 52 (1957), 1676 (dort weitere Lit.)
- 2) Mathies, H.: Arzneim.Forsch. 8 (1958), 233
- 3) Mathies, H. u. Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35 (1957), 892
- 4) Mathies, H. u. Werther, G.v.: Arzneim.Forsch. im Druck
- 5) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 6) Mathies, H.: Zschr. ges. exper. Med. 131 (1959), 118
- 7) Mathies, H.: Med. Mschr. 12 (1958), 685
- 8) Jankowski, A.: Diss. München 1957
- 9) Gerson, U.: Diss. München in Vorbereitung
- 10) Schlierf, G.: Diss. München in Vorbereitung
- 11) Roesch, U.: Diss. München in Vorbereitung
- 12) Mathies, H.: Fortschr. d. Med. 74 (1956), 35
- 13) Mathies, H.: Pharmazie 12 (1957), 1
- 14) Terbrüggen, A.: Dtsch. med. Journ. 5 (1954), 312
- 15) Terbrüggen, A.: Ärztl. Prax. 6 (1954), 40
- 16) Abrahams, G. u. Glynn, J.: Clin. Sci. 8 (1949), 171
- 17) Evers, A.: zit. Schliephake E. u. Smets, R.: Münch. med. Wschr.
97 (1955), 56
- 18) Glick, D. u. Sylven, B.: Science 113 (1951), 388
- 19) Guerra, F.: Science 103 (1946), 696
- 20) Hartmann u. Matijevic: Zschr. Rheumaforsch. 11 (1952), 23
- 21) Jahnke: Ärztl. Wschr. 6 (1951), 1153
- 22) Klemperer, A.: Amer. J. Med. 10 (1951), 405
- 23) Meyer, K.: Physiol. Rev. 27 (1947), 335
- 24) Rimington, C.: Ann. Rheumat. Dis. 8 (1949), 34
- 25) Seifter, J. u. Mitarb.: Proc. Soc. exper. Med. Biol. 72 (1949), 277
- 26) Schoen, R.: Dtsch. med. Wschr. 77 (1952), 558
- 27) Stepantschitz, G.: Öster. Ärztekongr. d. Van-Svieten-Ges. Salzburg
September 1953
- 28) Stepantschitz, G. u. Kresbach, E.: Zschr. Rheumaforsch. 13 (1954), 266
- 29) Dorfman, E.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 52 (1950), 1098
- 30) Good, R. u. Glick, D.: J. Infect. Dis., Chicago 86 (1950), 38
- 31) Grais, M.L. u. Glick, D.: J. Infect. Dis., Chicago 85 (1949), 101
- 32) Page, F.: Lancet 261 (1951), 755
- 33) Haydu: Amer. Journ. med. Science 225 (1953), 71-75

- 34) Bagnall, A.: Canad. M.A.J. Aug. 1. 1957, Vol. 77, 182
- 35) Busch, L.: Pharmaz. Wiss. Lit. Abt. Bayer-Leverkusen. Aus Anlage
zu Bundschr. 10 W/A v. 10.1.1958 (Resochin)
- 36) Wilhelmi, G.: zit. Domenjox (39)
- 37) Probst, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 38) Ballabio u. Amira: Ther. Bericht 2 (1958), 259
- 39) Domenjox, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225 (1955), 14
- 40) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 41) Jung, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 42) Schwank, M.: Diss. München in Vorbereitung

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und besonders auch Herrn Dr. H. Mathies für die Anregung zu dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas. Ebenfalls möchte ich danken Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich für die Durchführung der statistischen Berechnungen.

Die Versuchsmengen des Resochin wurden uns freundlicherweise von den Farbenfabriken Bayer Leverkusen zur Verfügung gestellt.

Ich wurde am 12.10.1931 in Greiding Kreis Hilpoltstein geboren, besuchte in Greiding die Volksschule und später die Oberrealschule für Jungen in Eichstätt, wo ich auch im Juli 1951 die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend daran studierte ich an der phil.-theol. Hochschule in Eichstätt und an der Universität München 5 Semester Philosophie. Ab Sommersemester 1954 wechselte ich auf die medizinische Fakultät über und bestand nach dem Wintersemester 1955/56 das Physikum. Im Wintersemester 1956/57 und im Sommer 1957 setzte ich mein Studium an der Freien Universität in Berlin fort. Seit Wintersemester 1957/58 bin ich wieder an der Universität in München und habe mich für den 1. Termin nach dem Wintersemester 1958/59 zur ärztlichen Prüfung angemeldet, die ich am 6. Juni 1959 bestand.

Mit der Bearbeitung meines Promotionsthemas begann ich im Frühjahr 1958 an der Medizinischen Poliklinik in München.

